

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 浅野 涼子

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻 生殖生育病態医学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 矢尾 正祐

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 小川 毅彦

副査 横浜市立大学大学院医学研究科准教授 奥寺 康司

学位論文:

子宮筋腫におけるエリスロポエチン発現とその腫瘍増大に対する影響

Aberrant expression of erythropoietin in uterine leiomyoma: implications in tumor growth

論文内容の要旨:

【背景・目的】

子宮筋腫(子宮平滑筋腫)は頻度が高い良性腫瘍であるにも関わらず、その増大機構は解明されていない点が多い。子宮筋腫の増大はエストロゲンとプロゲステロンに依存することは既知の事実である。しかしながら、多くの子宮筋腫が緩徐に増大する中、一部のものは急速に増大し、時に骨盤腔を超えるような巨大な腫瘍を形成するが、これらの差違は解明されていない。エリスロポエチン(EPO)は赤血球形成に欠かせない糖タンパクホルモンである。EPO と子宮筋腫との関連は子宮筋腫に続発性多血症を呈する myomatous erythrocytosis syndrome(MES)の存在で報告されてきた。MES は稀な疾患であり子宮筋腫を摘出することによって多血症が改善するが、その発症機序に関しては様々な説がある。これまでの研究では MES 症例の子宮筋腫による *EPO* mRNA またはタンパクの発現が報告されており、子宮筋腫細胞が産生する EPO が多血症の原因となっていることが示唆される。MES 症例に関する臨床病理学的な検討ではこれらの子宮筋腫は非常に大きく、また約半数の症例は閉経後であった。このことからEPOは子宮筋腫を増大させる因子であり、また閉経前も閉経後も子宮筋腫を増大させることが推察される。本研究は通常の子宮筋腫による EPO の発現と子宮筋腫径との関連を解析し、さらに腫瘍増大との関連を検討することにより、EPO の子宮筋腫の増大因子としての可能性、および役割を明らかにすることを目的としている。

【対象・方法】

当院で2005年から2012年に子宮摘出または子宮筋腫摘出術を施行された症例の手術摘出検体から子宮筋腫組織114個、対応する正常子宮筋層組織は17個を採取した。採取した組織は液体窒素で急速冷凍した後-80℃に保存するか、ホルマリンで十分固定した後にパラフィンブロックを作成した。-80℃に保存した組織よりRNA抽出しreal-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)法で *EPO* mRNA の発現量を検討した。内因性コントロールには β -actin(*ACTB*)を使用した。*EPO* mRNA の発現量が最も高い群と低い群においてはenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法により組織の EPO タンパク発現量も確認した。さらに、EPO 発現量と臨床病理学的な背景との関連を後方視的に検討した。また HE 染色、血管内皮細胞を識別可能にする CD34 免疫組織化学法を用いて腫瘍内の血管密度、および血管成熟度を評価した。血管密度は200倍視野の3視野の平均を用いた。血管成熟度は5段階で血管径、血管壁の厚さで評価する血管成熟スコアを作成し、スコア4~5を高値とした。

【結果】

Real-time RT-PCR 法で子宮筋腫の114例中108例、95%に *EPO* mRNA 発現が検出された。この中にMESを呈した症例は1例であった。正常子宮筋層と比較すると、子宮筋腫において有意に

EPO mRNA 発現が高かった (3836 ± 4122 vs. 1455 ± 2141 , $P = 0.025$; Wilcoxon signed-rank test). *EPO* mRNA が最も高発現であった 15 例 (高発現群) と最も低発現であった 15 例 (低発現群) および正常子宮筋層 3 例を ELISA 法で解析した. *EPO* mRNA 高発現群と低発現群を比較すると *EPO* タンパク発現量に有意な差があった (18.7 ± 16.5 vs. 1.0 ± 1.0 mIU/mg protein; $P < 0.001$ Mann-Whitney *U* test). また, これらに正常子宮筋層 3 例を含めた計 33 例で *EPO* mRNA と *EPO* タンパク発現量には強い相関が認められ (Spearman rank correlation coefficient $\rho = 0.828$, $P < 0.001$), *EPO* mRNA に伴って *EPO* タンパクも発現していることが確認された. *EPO* mRNA 発現量は子宮筋腫の大きさと正の相関を呈しており (Spearman rank correlation coefficient $\rho = 0.294$, $P = 0.001$), *EPO* と子宮筋腫増大との関連が示唆された. また, *EPO* mRNA 高発現群では低発現群に比較して血管成熟が促進している傾向が認められた (血管成熟スコア高値率; *EPO* mRNA 高発現群 vs. 低発現群: 67% vs. 20%, $P = 0.013$ Fisher's exact test). その一方で血管密度は 2 群間に差がなかった.

【考察】本研究では子宮筋腫における *EPO* mRNA およびタンパクの発現を解析した. *EPO* mRNA の発現はほとんどの子宮筋腫で確認することができたが, その量は非常に少ないものから正常子宮筋層の 18 倍に及ぶものまでばらつきがあった. *EPO* mRNA 発現量と子宮筋腫の最大径には正の相関があり, *EPO* が子宮筋腫の増大に関わっている可能性を示している. *EPO* には赤血球の分化増殖作用の他に様々な機能があることがわかっており, これには血管成熟作用も含まれる. 我々は自験した MES 症例の病理組織像において腫瘍内血管が明らかに拡張しており, 血管平滑筋の増生も観察できたことから, 子宮筋腫による異常な *EPO* 分泌が子宮筋腫内の血管新生, または血管成熟に影響をおよぼしているとの仮説を立てた. 今回の検討により *EPO* mRNA 高値群では低値群の子宮筋腫と比較して血管が成熟している傾向が見られた. この結果は *EPO* 受容体が子宮筋腫内の平滑筋にも発現しているが, 主に血管内皮細胞に存在するとして過去の報告とも矛盾せず, *EPO* が子宮筋腫内の血管に作用し子宮筋腫の増大に関与している可能性が考えられる.

【結論】

多血症を呈さない通常の筋腫であっても, 一部の子宮筋腫では *EPO* を高発現しており, 腫瘍自体が分泌している *EPO* が血管成熟を促進することにより子宮筋腫の増大を促している可能性が示唆された. 子宮筋腫は非常に多くの女性が罹患する疾患であるが, *EPO* により子宮筋腫が巨大化する機序を解明することができれば新たな治療ターゲットや子宮筋腫の増大傾向を示すマーカーとして使用できる可能性がある.

審査結果の要旨:

多血症を呈さない子宮筋腫の多くは *EPO* を発現しており, また一部の子宮筋腫では *EPO* を非常に高発現していることが示された. *EPO* 高発現の子宮筋腫は血管がより成熟している傾向が見られ, 子宮筋腫自体が分泌している *EPO* が血管成熟を促進することにより腫瘍増大を促している可能性が示唆された. 子宮筋腫の遺伝子異常として最も頻度が高いものに *MED12* 変異があるが, *MED12* 野生型の子宮筋腫では *EPO* mRNA 発現がエストロゲンにより亢進する. このことから,

*MED12*野生型の子宮筋腫ではエストロゲンにより子宮筋腫がEPOという重要な成長因子の発現を亢進させ、腫瘍増大を促進する可能性が考えられる。*MED12*変異型と野生型ではエストロゲンに対する反応が異なる原因として、*MED12*変異により*MED12*タンパクに構造異常が生じ、それに伴ったcyclin-dependent kinase 8(CDK8)活性低下がエストロゲン感受性の低下を引き起こすことが考えられる。

審査にあたり上記内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

奥寺康司副査から以下のような論評と質問がなされ、それぞれに回答がされた。

1. 子宮筋腫初代培養細胞の不死化を試みているとのことだが成功しているのか。一般的に正常細胞を不死化するためには *p16* shRNA, *TERT* 遺伝子のみの導入で十分とされているがどうか。

回答:子宮筋腫細胞に *p16* shRNA, *TERT* 遺伝子を導入したが次第に分裂が遅くなり、おそらく不死化が成功していない。*p16* shRNA, *TERT* 遺伝子と *MYC* 遺伝子導入した細胞は安定して継代できており、現在までに約 50 回継代している。

2. 遺伝子導入実験は 3 回に分けて行ったのか。

回答:*p16* shRNA と *TERT* 遺伝子は一つのウィルスベクターを作成しており、それと同時に *MYC* 遺伝子導入を行った。*MYC* 遺伝子の導入のみはだけでも不死化できたかもしれないが試みていない。

3. *MYC* 遺伝子を導入したことで不死化した細胞のがん化が起こっている可能性があるのではないか。

回答:その可能性はある。今後腫瘍形成モデルを作成できれば病理組織学的に評価できる。

4. 子宮筋腫が産生する EPO と太い血管が直接関連しているのか。太い血管は EPO ではなく、ただ大きい腫瘍と関連している可能性があるのではないか。

回答:EPO が高いと太い血管があって腫瘍も大きい。EPO と関連して血管成熟するわけでは無く大きい腫瘍は EPO も高いが別の機序で血管が成熟している可能性はある。EPO の子宮筋腫における血管成熟作用は今後 *in vitro* か子宮筋腫の動物モデルを作成し、証明していく必要がある。

5. *MED12* 野生型の方が変異型より EPO 発現量が高かったということは、*MED12* 野生型の子宮筋腫の方が大きくなるのか。

回答:*MED12*変異型の方が統計的には小さいといった報告が既にある。今回データの提示はしなかったが、本研究の子宮筋腫においても *MED12*変異型の方が有意に小さかった。

6. *MED12* 変異型の子宮筋腫はエストロゲン感受性が弱くて大きくなれない。その一方で、*MED12* 野生型はエストロゲン感受性が強いといった考察から、閉経前の大きな子宮筋腫の多くは *MED12* 野生型でエストロゲン感受性が高いことが増大の原因であるということか。

回答:そのように仮説を立てているが現段階では証明は不十分である。

7. *MED12*野生型の子宮筋腫の遺伝子異常は解明されているのか。子宮筋腫で変化がある遺伝子というのはわかっているのか。

回答:子宮筋腫発生の原因となる主要な driver gene が明らかになってきている。MED12 変異に次いで多いのが、12q15, 6p21 の再編成が認められる子宮筋腫であり、これらにおいてはそれぞれ HMGA2 (high mobility group AT-hook 2), HMGA1 (high mobility group AT-hook 1) の発現が亢進する。

また小川毅彦副査からは以下のような論評と質問がなされ、それぞれに回答がされた。

1. 血管成熟スコアは引用したものなのか。また血管新生が強く、血管数が多い検体では血管が成熟している傾向と判断されてしまうのではないのか。

回答:血管成熟スコアは我々が作成したものであり、脈管数が多くても血管径が 20μm 以下のものが主で、かつ平滑筋が未発達のもの血管成熟度を低スコア、血管径が 20μm を超えるものが存在し平滑筋の裏打ちが観察できるものを高スコアとした。このスコアでは血管数が多いのみでは血管が成熟しているとは判断していない。EPO 発現が高い子宮筋腫では血管成熟スコアが高いものが有意に多かった。血管成熟度とは別に、血管密度は 200 倍視野あたりの脈管数で評価しており、これは EPO 発現量によって有意な差は無かった。

2. 大きい血管があると成熟度が高いという評価方法だと、腫瘍内の部位によって評価が異なることは無いのか。

回答:子宮筋腫の辺縁部は太い血管があるが、他は強い変性がある部分を除いて腫瘍内血管の成熟度や密度に大きな差は無い。辺縁の部分では太い血管が存在するので中心部で評価している。

3. 子宮筋腫の遺伝子異常から全ての子宮筋腫細胞はモノクローナルと言えるのか。

回答:基本的に子宮筋腫はモノクローナルな腫瘍と言ってよいが、子宮筋腫の次世代シーケンシングを行った研究により、一部の子宮筋腫では一次的な遺伝子異常に加えてさらに他の遺伝子異常を来している子宮筋腫の存在もあるとされている。

4. EPO の発現量は子宮筋腫内で均一なのか。免疫組織化学では観察できないのか。

回答:EPO の免疫組織化学を試みたがプレパラート全体が濃く染まってしまうため、発現量の差を評価することが困難であった。数例の子宮筋腫内で数か所組織をサンプリングし、EPO mRNA 発現量を評価したところ腫瘍内で完全に均一ということではないようである。要因として腫瘍内の血流の差や低酸素の影響が考えられる。

さらに矢尾正祐主査から以下のような論評と質問がなされ、それぞれに回答がされた。

1. 血管成熟を評価するにあたって血管の周皮細胞について評価を行ったか。

回答:免疫組織化学法で周皮細胞を染色するのに通常は抗 SMA (smooth muscle actin) 抗体や抗 PDGFR-β (platelet-derived growth factor receptor-beta) 抗体を用いる。これらは平滑筋細胞も染色してしまうため、試していない。この他に形態学的に周皮細胞を評価する方法があるが、正確に周皮細胞を鑑別することが困難である。したがって、本研究では血管径と血管壁の厚みで血管成熟度を評価している。

2. EPO は生体内では分泌性のタンパクと考えられるが、過去文献で報告されている EPO の腎外産生ではどのように産生を確認しているのか。培養細胞の上清内の EPO タンパク発現等を出しているのか。

回答:子宮の EPO 産生に関してはマウスの組織培養を行い、低酸素とエストロゲンに反応して *EPO* mRNA に変化をきたすことを評価しており、タンパクの評価も組織を用いていた。その他の精巣、胎盤なども組織の *EPO* mRNA およびタンパクを評価しており、細胞培養の上清タンパクを評価はしていなかった。子宮筋腫培養の実験では *EPO* mRNA の発現量を測定した。今後は子宮筋腫培養細胞の上清内の EPO タンパク分泌の有無を検討していきたい。

3. 子宮筋腫の *EPO* mRNA 高発現の症例のなかに多血症を呈しているようなものはみられたか。

回答:今回の検討では多血症を呈していた症例は 1 例のみであった。多血症の症例よりも子宮筋腫の *EPO* mRNA 発現量が高い症例が 10 例あったが、これらの術前血中ヘモグロビン値は正常か低値であった。手術適応となる子宮筋腫では過多月経を合併していることが多いため、慢性的な出血により多血症が認められない可能性がある。また、子宮筋腫の患者では過多月経を訴えているが血中ヘモグロビン値の低下が認められない症例が多く、子宮筋腫が産生する EPO が貧血を相殺している可能性がある。

4. 手術前後での患者血中の EPO 値は今回測定したか。

回答:術前ヘモグロビン値は正常な症例が多かった為、多血症を呈した症例以外では EPO の測定を定常的に行っていない。子宮筋腫の存在により EPO が上昇している可能性や、過多月経により腎臓からの EPO 分泌が上昇している可能性も考察される。

5. 今回の研究知見をもとに薬物治療等の開発の可能性はどうか。

回答:Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) antagonists など他の治療が無効の子宮筋腫に対して CDK8 inhibitor が効果ある可能性がある。CDK8 inhibitor はエストロゲン受容体の感受性を低下させ、子宮筋腫のエストロゲンを介した EPO 産生亢進を抑制できるかもしれない。正常細胞に対する副作用がほとんどなく安全性が高いとされており、悪性腫瘍においての研究が進んでいるところである。また、soluble EPO receptor も EPO 受容体作用を阻害することで子宮筋腫の増大を抑制できる可能性がある。これらの薬剤の良性腫瘍に対する効果はまだ研究が進んでいない。

これら以外にもいくつかの質問がなされたが申請者によりいずれも的確な返答がなされた。

以上の審査より、申請者は本課題に対して深い理解と洞察を持って研究を遂行し、新たな学術的知見を得たことを証明した。よって申請者は医学博士を授与されるに相当であると判断した。